

13.01.00

日本国特許庁 09/889324
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 03 MAR 2000

PCT

3900/132
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年10月29日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第309238号

出願人

Applicant(s):

科学技術振興事業団

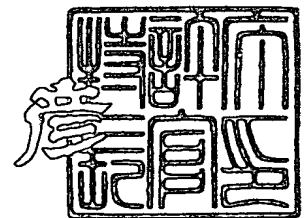
PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月18日



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3007038

【書類名】 特許願

【整理番号】 A031P52

【提出日】 平成11年10月29日

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01K 67/027

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東6-17-18-202

 【氏名】 審良 静男

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県西宮市里中町3-11-10-303

 【氏名】 竹内 理

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

 【代表者】 中村 守孝

【代理人】

 【識別番号】 100107984

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 044347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細菌の菌体成分不応答性モデルマウス

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 T L R 2 遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物。

【請求項 2】 非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項 1 記載の非ヒト動物。

【請求項 3】 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 2 記載の非ヒト動物。

【請求項 4】 マウス遺伝子ライブラリーからマウス E S T クローン由来のプローブを用いてスクリーニングすることにより得られた T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲッティングベクターを構築し、該ターゲッティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、T L R 2 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とする T L R 2 ノックアウトマウス。

【請求項 5】 ペプチドグリカンに対して不応答性であることを特徴とする非ヒト動物。

【請求項 6】 グラム陽性菌細胞壁面分に対して低応答性であることを特徴とする非ヒト動物。

【請求項 7】 非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項 5 又は 6 記載の非ヒト動物。

【請求項 8】 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 7 記載の非ヒト動物。

【請求項 9】 T L R 2 ノックアウトマウスと野生型マウスに被検物質を投与して、該 T L R 2 ノックアウトマウス由来及び野生型マウス由来のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を比較評価することを特徴とする T L R 2 対

するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項 1 0】 T L R 2 ノックアウトマウスと T L R 4 ノックアウトマウスに被検物質を投与して、該 T L R 2 ノックアウトマウス由来及び T L R 4 ノックアウトマウス由来のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を比較評価することを特徴とする T L R 2 及び／又は T L R 4 に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、T L R 2 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、ペプチドグリカンに対して不応答性である T L R 2 遺伝子機能が欠損した非ヒト動物や、グラム陽性菌細胞壁画分に対して低応答性であることを特徴とする非ヒト動物や、これらを用いた T L R 2 等に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

トール (T o l l) 遺伝子は、ショウジョウバエの胚発生中の背腹軸の決定 (Cell 52, 269-279, 1988、Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996)、また成体における抗真菌性免疫応答に必要であることが知られている (Cell 86, 973-983, 1996)。かかる T o l l は、細胞外領域にロイシンリッチリピート (L R R) を有する I 型膜貫通受容体であり、この細胞質内領域は、哺乳類インターロイキン-1 受容体 (I L - 1 R) の細胞質内領域と相同性が高いことが明らかとなっている (Nature 351, 355-356, 1991、Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996、J. Leukoc. Biol. 63, 650-657, 1998)。他の T o l l ファミリーメンバーである 1 8 - w h e e l e r は、抗菌ホスト防御に関わっているが抗真菌性免疫応答には関わらないことが明らかになっており、T o l l 経路の選択的活性を介し、ショウジョウバエにおいて特定の病原体が特異的抗菌性免疫応答を誘導することも明らかとなっている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14614-14619, 1997、EMBO J. 16, 6120-6130, 1997、Curr. Opin. Immunol. 11,

13-18, 1999)。

【0003】

近年、Toll様受容体 (TLR) と呼ばれるTollの哺乳類のホモログが同定され、TLR2やTLR4など現在までに6つのファミリーが報告されている (Nature 388, 394-397, 1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 588-593, 1998、Blood 91, 4020-4027, 1998、Gene 231, 59-65, 1999)。このTLRファミリーは、上記IL-1Rと同様にアダプタータンパク質であるMyD88を介し、IL-1R結合キナーゼ (IRAK) をリクルートし、TRAF6を活性化し、下流のNF- κ Bを活性化することが知られている (J. Exp. Med. 187, 2097-2101, 1998、Mol. Cell 2, 253-258, 1998、Immunity 11, 115-122, 1999)。また、哺乳類におけるTLRファミリーの役割は、細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体 (PRR: pattern recognition receptor) として、先天的な免疫認識に関わっているとも考えられている (Cell 91, 295-298, 1997)。

【0004】

上記PRRにより認識される病原体会合分子パターン (PAMP: pathogen-associated molecular pattern) の一つは、グラム陰性菌の外膜の主成分であるリポ多糖 (LPS) であって (Cell 91, 295-298, 1997)、かかるLPSが宿主細胞を刺激して宿主細胞にTNF α 、IL-1及びIL-6等の各種炎症性 (proinflammatory) サイトカインを産生させること (Adv. Immunol. 28, 293-450, 1979、Annu. Rev. Immunol. 13, 437-457, 1995) や、LPS結合タンパク質 (LBP: LPS-binding protein) により捕獲されたLPSが細胞表面上のCD14に引き渡されることが知られている (Science 249, 1431-1433, 1990、Annu. Rev. Immunol. 13, 437-457, 1995)。しかしながら、CD14は膜貫通ドメインのないグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質であり、LPSに対する真のシグナル伝達受容体の存在が考えられている。

【0005】

上記TLRファミリーに属するTLR4はグラム陰性菌菌体成分であるLPSのシグナル伝達分子であり、かかるTLR4をトランスフェクションすると、NF- κ Bの持続的低活性化をもたらす (J. Exp. Med. 188, 2091-2097, 1998、N

ature 395, 284-288, 1998)。他方、TLR 2 もインビトロでヒト胎児腎臓 293 細胞 (human embryonic kidney 293 cells) に過剰発現させると LPS のシグナルを細胞内に伝えることから、LPS レセプターの候補であると考えられていた。また、Godawski のグループは、ヒト TLR 2 が CD14 と相互作用して LPS 受容体複合体を形成すると報告している (J. Immunol. 163, 639-643, 1999)。LPS での刺激処理は受容体をオリゴマー化し、次に IRAK を受容体複合体に動員する。これとは対照的に、Politorak らと Qureshi らのグループは、ポジショナルクローニング法により、TLR 4 が C3H/HeJ マウスの LPS 低応答性に関する原因遺伝子 (causative gene)、すなわち Lps 遺伝子であることを報告している (Science 282, 2085-2088, 1998、J. Exp. Med. 189, 615-625, 1999)。

【0006】

本発明者らは、TLR 4 が実際に LPS シグナル伝達に関わっていることを TLR 4 欠損マウスを作製することにより明らかにしている (J. Immunol. 162, 3749-3752, 1999) が、これは TLR の一次構造における種特異的差異によるもの、つまりマウスでは TLR 4、ヒトでは TLR 2 により介されている可能性がある。しかしながら、マウス TLR 2 も LPS に対する応答で NF- κ B を活性化したとの報告がある (J. Immunol. 162, 6971-6975, 1999)。また、Chow らは、C3H/HeJ マウスに関する結果と一致する結果、すなわちヒト TLR 4 が投与量依存又は時間依存による LPS/CD14 に対する刺激によって NF- κ B を介する遺伝子発現を活性化し、ヒト 293 細胞を用いた場合には Kirschning らのグループと矛盾する結果を得て、これは 293 細胞のロットの差にもよるものと推測されると報告している (J. Biol. Chem. 274, 10689-10692, 1999)。

【0007】

最近、TLR 2 がグラム陰性菌由来の LPS に対する反応性のみに関わっているのではなく (J. Immunol. 162, 6971-6975, 1999)、別の共通細菌構造パターンであるグラム陽性菌由来のペプチドグリカン (PGN) とリポタイコ酸 (LTA) のシグナル伝達受容体として作用するとの報告がある (J. Biol. Chem. 274, 17406-17409, 1999、J. Immunol. 163, 1-5, 1999) また、全グラム陽性菌、

可溶性 PGN 及び LTA が、TLR 2 を発現する 293 細胞の NF- κ B 活性化を誘導したのに対して、TLR 1 や TLR 4 を発現する細胞内の NF- κ B 活性化を誘導しなかったことも報告されている (J. Biol. Chem. 274, 17406-17409, 1999)。また、TLR 4 ではなくヒト TLR 2 を発現するチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 繊維芽細胞を、熱殺菌したスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) 及びストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) 並びにスタフィロコッカス・アウレウス由来 PGN により同様に活性化したとの報告がなされている (J. Immunol. 163, 1-5, 1999)。

【0008】

他方、マイコバクテリウム (*mycobacterium*) とボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) 由来のリポタンパク質/リポペプチドが、インビトロでの TLR 2 を介する宿主細胞の活性化を誘導した (Science 285, 736-739, 1999, Science 285, 732-736, 1999)。しかしながら、過剰発現実験から得られる結果は必ずしもインビボでの TLR ファミリーの機能を反映していない。このような応答性を NF- κ B 活性化に基づいて分析した結果も、これら刺激により仲介される生物学的応答には関連しない (Infect. Immun. 66, 1638-1647, 1998) と報告されている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

インビボにおける菌体成分に対する応答は、細胞表面上の各 TLR の発現レベルの差異により変化することが予測されるものの、未だインビボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対する TLR ファミリーの各メンバーの関わりは明らかにされていない。本発明の課題は、インビボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対する TLR ファミリー各メンバーの関わり、特に TLR 2 のインビボにおける役割を明らかにする上で有用な、TLR 2 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、ペプチドグリカンに対して不応答性である TLR 2 遺伝子機能が欠損した非ヒト動物や、グラム陽性菌細胞壁成分に対して低応答性であることを特徴とする非ヒト動物や、これらを用いた TLR 2 等に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究した結果、プラスミドベクターを用いてES細胞で相同的組換えによってTLR2遺伝子の細胞内領域を含むエキソン領域をネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、またC末端側にHSV-tk遺伝子を導入させて、G418とガンシクロピアに対して2重に抵抗力のあるES細胞クローンをスクリーニングし、このES細胞クローンをC57BL/6のマウスの胚盤胞(blastocysts)の中に注入し、その生殖系列をとおして、メンデルの法則に従い出生してくるTLR2遺伝子機能が欠損したTLR2ノックアウトマウスが、生まれてから20週間は明らかに異常を示さないトランスジェニックマウスであり、また、かかるTLR2ノックアウトマウスがグラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンに対して不応答性であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち本発明は、TLR2遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする非ヒト動物(請求項1)や、非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項1記載の非ヒト動物(請求項2)や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項2記載の非ヒト動物(請求項3)に関する。

【0012】

また本発明は、マウス遺伝子ライブラリーからマウスESTクローン由来のプロンプを用いてスクリーニングすることにより得られたTLR2遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリAシグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲッティングベクターを構築し、該ターゲッティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、TLR2遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とするTLR2ノックアウトマウス(請求項4)に関する。

【0013】

さらに本発明は、ペプチドグリカンに対して不応答性であることを特徴とする非ヒト動物（請求項5）や、グラム陽性菌細胞壁画分に対して低応答性であることを特徴とする非ヒト動物（請求項6）や、非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項5又は6記載の非ヒト動物（請求項7）や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項7記載の非ヒト動物（請求項8）に関する。

【0014】

またさらに本発明は、TLR2ノックアウトマウスと野生型マウスに被検物質を投与して、該TLR2ノックアウトマウス由来及び野生型マウス由来のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を比較評価することを特徴とするTLR2に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法（請求項9）や、TLR2ノックアウトマウスとTLR4ノックアウトマウスに被検物質を投与して、該TLR2ノックアウトマウス由来及びTLR4ノックアウトマウス由来のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を比較評価することを特徴とするTLR2及び／又はTLR4に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法（請求項10）に関する。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明において、TLR2遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、染色体上のTLR2遺伝子の一部もしくは全部が破壊・欠損・置換等により不活性化され、野生型において発現されるTLR2を発現する機能を失った非ヒト動物をいい、また、TLR2遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0016】

本発明における野生型の非ヒト動物とは、上記TLR2遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と同腹の非ヒト動物をいい、マウスの場合を例にとると、メンデルの法則に従い出生してくるF2マウスのうち、TLR2非欠損型の同腹

のマウスをいう。これら F2 マウスにおける欠損型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができる。上記 TLR2 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物の作製方法を、TLR2 が欠損したノックアウトマウスを例にとって以下説明する。

【0017】

TLR2 遺伝子は、マウス遺伝子ライブラリーを PCR 法等により増幅し、マウス EST クローン由来等のプローブを用いてクローニングすることができる。このクローニングされた TLR2 遺伝子を組換え DNA 技術により、TLR2 遺伝子の全部又は一部、例えば TLR2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位の全部又は一部を、ポリ A シグナル遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子等マーカー遺伝子で置換し、5' 末端側にジフテリアトキシン A フラグメント (DT-A) 遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-tk) 遺伝子等の遺伝子を導入してターゲティングベクターを作製し、この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション法等により胚幹細胞 (ES 細胞) に導入して培養後、G418 やガンシクロビア (GANC) 等の抗生物質により相同的組換えを起こした ES 細胞を選択する。この選択された ES 細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。

【0018】

上記組換え ES 細胞をマウスの胚盤胞 (blastocysts) 内にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に戻すことによってキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスは、キメラ率がよいと生まれてくるキメラマウスが雄に片寄るため、野生型の雌と交配させることによってヘテロ組換えマウス (+/-: F1) を作出し、そのヘテロ組換えマウスの雄と雌を交配させることによってホモ組換えマウス [F2; 野生型マウス (+/+), TLR2 ノックアウトマウス (-/-)] を得ることができ、これらはすべてメンデルの法則に従い産み出される。そして、本発明の TLR2 ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスの腹腔マクロファージから RNA を単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの TLR2 の発現をウェスタンブロット法等により調べる方法がある。

【0019】

得られたTLR2ノックアウトマウスがグラム陽性菌等の細胞壁成分ペプチドグリカンに対して不応答性であることや、グラム陽性菌細胞壁画分に対して低応答性であることは、例えば、TLR2ノックアウトマウスのマクロファージや脾臓B細胞に、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン等の存在下において、例えばTNF誘発、脾臓細胞増殖応答、脾臓B細胞表面でのMHCクラスII抗原の発現を測定することにより確認することができる。

【0020】

本発明のTLR2ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓細胞は、ペプチドグリカンに対して不応答性であり、グラム陽性菌細胞壁画分に対して低応答性であって、LPSをはじめとしてLTAやIL-4に対して応答性であることから、上記TLR2ノックアウトマウスは、ペプチドグリカン、グラム陽性菌細胞壁画分等の作用機序の解明に有用なモデルとすることができる。

【0021】

また、本発明によると、上記のTLR2ノックアウトマウスと野生型マウスに被検物質をそれぞれ投与して、例えばこれらマウスに被検物質を直接投与し、あるいはこれらマウス由来の腹腔マクロファージ又は脾臓細胞に被検物質を接触させ、該マクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を検出して比較評価することにより、TLR2に対するアゴニスト又はアンタゴニストをスクリーニングすることができる。また、TLR2ノックアウトマウスとTLR4ノックアウトマウス、さらに必要に応じて野生型マウスに被検物質をそれぞれ投与して、該TLR2ノックアウトマウス由来及びTLR4ノックアウトマウス由来等のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を比較評価することにより、TLR2及び／又はTLR4に対するアゴニスト又はアンタゴニストをスクリーニングすることもできる。

【0022】

【実施例】

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれら実施例により限定されるものではない。

参考例 (TLR 4 欠損マウスの作製)

TLR 2 欠損マウスと TLR 4 欠損マウスを用いて、グラム陰性菌及びグラム陽性菌の細胞壁成分に対する応答性を比較するために、TLR 4 欠損マウス (129/OlaXC57BL/6 から交配した F₂) を本発明者らの報告 (J. Immunol. 162, 3749-3752, 1999) に準じてジーンターゲティング法により作製した。

【0023】

実施例 1 (TLR 2 ノックアウトマウスの作製)

129/SvJ マウス遺伝子ライブラリー (ストラタジーン社製) から、ヒト TLR 2 遺伝子と類似したマウス EST クローン (登録番号 D77677) 由来のプロープを用いて、TLR 2 遺伝子をスクリーニングし、pBluescript ベクター (ストラタジーン社製) 中でサブクローンし、制限酵素マッピング及び DNA 配列決定により特定した。ターゲッティングベクターは、TLR 2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位 1.3 kb の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルをもつ pMC1-neo (ストラタジーン社製) に置換することにより構築した。かかるターゲッティングベクターは、4.8 kb の 5' 遺伝子フラグメントと 1.0 kb の 3' 遺伝子フラグメントとをフランキング配列として有し、HSV-tk カセットを 5' 末端に含んでいる。このターゲッティングベクターを SalI により線状化し、胎生 14.1 日目の胚幹細胞 (ES 細胞) にエレクトポレーションし、G418 及びガンシクロピアに抵抗性を示す 120 個のクローンを、PCR による相同組換えのためにスクリーニングし、図 1A に示すプロープを用いるザンブロット分析により 9 個を確かめた。

【0024】

突然変異 TLR 2 対立遺伝子含有していた 3 個の標的 ES クローンを、C57BL/6 マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製した。この雄のキメラマウスと C57BL/6 雌マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによってホモ接合体マウスを得た (図 1B)。なお、本発明の TLR 2 欠損マウスはメンデルの法則に従い作製することができ、20 週目までは顕著な異常を示さな

かった。

【0025】

突然変異によりTLR2遺伝子の不活性化が生起していることを確認するため、野生型マウス（+/+）及びTLR2ノックアウトマウス（-/-）の腹腔マクロファージ（ 5×10^6 ）から抽出した全RNA（15 μ g）を電気泳動にかけナイロン膜に移して、文献（Immunity 9, 143-150, 1998）記載の方法と同様に、 $[^{32}\text{P}]$ で標識したTLR2に特異的なcDNA又はGAPDH（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）に特異的なcDNAを用いてノーザンブロット分析を行った。これらの結果から、TLR2 mRNAはTLR2欠損マウスの腹腔マクロファージからは検出されなかった（図1C）。また、TLR2ノックアウトマウスの胸腺細胞及び脾臓細胞中のCD3、B220、CD4及びCD8の発現は、野生型マウスのものと比較しても差異がなかった（図は示さず）。

【0026】

実施例2（TLR2ノックアウトマウスのエンドトキシン応答性）

本発明のTLR2ノックアウトマウス（5匹）、TLR4ノックアウトマウス（5匹）及び野生型マウス（5匹）に、それぞれ大腸菌（O55:B5）由来のLPSを1mg投与し、その生存率によりLPS不応答性を調べた。結果を図2に示す。図2より、本発明のTLR2ノックアウトマウス（TLR2-/-）及び野生型マウスはLPSに応答し、投与後4日でほとんどが死亡したのに対して、TLR4ノックアウトマウス（TLR4-/-）は、LPS投与後6日目においても死亡するものはなく、エンドトキシン不応答性であることを確認することができた。

【0027】

実施例3（TLR2ノックアウトマウスのグラム陰性菌の菌体成分に対する応答性）

TLR2ノックアウトマウス（TLR2-/-）、TLR4ノックアウトマウス（TLR4-/-）及び野生型マウス（wild-type）のそれぞれの腹腔内に4%のチオグリコール酸培地（DIFCO社製）を2mlずつ注入し、3日後に各マウスの腹腔内から腹膜滲出細胞を単離し、これらの細胞を10%のウ

シ胎仔血清（GIBCO社製）を添加したRPMI1640培地（GIBCO社製）中で37℃にて2時間培養し、氷温のハンクス緩衝液（Hank's buffered salt solution: HBSS; GIBCO社製）で洗浄することにより非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹膜マクロファージとして以下の実験に使用した。

【0028】

得られた各腹膜マクロファージを $\text{INF}\gamma$ （30 unit/ml）の存在下又は非存在下において、1.0 ng/mlの大腸菌由来の合成リピドA（506化合物；第一化学薬品社製）又はサルモネラ・ミネソタRe-595由来のLPS（シグマ社製）といっしょに24時間培養した。なお、かかる合成リピドAとしては、0.025%のトリエチルアミンを含有し、エンドトキシンを全く含有しない水に可溶化したものを用いた。培養後、培養上清中のIL-6（図3A）、 $\text{TNF}\alpha$ （図3B）、 NO_2^- （図3C）の産生量を測定した。なお、IL-6は固相酵素免疫検定法（ELISA; ENDOGEN社製）により、 $\text{TNF}\alpha$ は製造者（Genzyme社製）の指示に基づきELISAにより、 NO_2^- は NO_2/NO_3 アッセイキット（同仁科学研究所社製）を使用したGreiss法により測定した。

【0029】

上記の結果から、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスのマクロファージでは、LPSやリピドAに対して同様な応答を示し、IL-6と $\text{TNF}\alpha$ を産生していた。また、LPSやリピドAに $\text{INF}\gamma$ を加え培養することにより、さらなる $\text{TNF}\alpha$ 産生の増大が確認できた。一方、TLR4ノックアウトマウスのマクロファージにおいては、IL-6と $\text{TNF}\alpha$ を産生しなかった。また、野生型マウス又はTLR2ノックアウトマウスから得られたマクロファージを $\text{INF}\gamma$ の添加したリピドA又はLPSにおいて培養することにより、 NO_2^- の産生が確認できた。また、リピドAやLPSの投与量を1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした場合も前記と同様の結果が得られた（図は示さず）。

【0030】

次に、図3Dに示す各種濃度のサルモネラ・ミネソタRe-595由来のLPSの存在下で、野生型マウス、TLR2ノックアウトマウス及びTLR4ノック

アウトマウスの各腹腔マクロファージを培養してTNF α の産生を測定した。この結果から、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスのマクロファージは、LPSの投与量に応じて同様な増加傾向を示すのに対し、TLR4ノックアウトマウスのマクロファージは、いかなる濃度でもTNF α を産生しなかった。

【0031】

実施例4（サルモネラ・ミネソタRe-595のLPSに対する応答性）

サルモネラ・ミネソタRe-595のLPSに対する各種マウス（Wild-type、TLR2-/-、TLR4-/-）の脾臓細胞の応答性について調べた。それぞれのマウスの脾臓細胞（ 1×10^5 ）を単離し、図4Aに示す各種濃度のLPSにより96ウェルプレート内で培養して刺激した。培養から40時間後に1 μ Ciの ^3H -チミジン（デュポン社製）を添加して更に8時間培養し、 ^3H の摂取量を β シンチレーションカウンター（パッカード社製）で測定した（図4A）。この結果から、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスの脾臓細胞では、LPSの投与量に依存して同様に細胞増殖反応を促進していたが、TLR4欠損マウスの脾臓細胞では、いかなる濃度のLPS刺激においてもLPSによる細胞増殖反応は見られなかった。

【0032】

また、フローサイトメトリーにより、Re-595のLPSに対する応答におけるB細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスII（I-A^b）の発現について調べてみた。野生型マウス、TLR2ノックアウトマウス（2-/-）、TLR4ノックアウトマウス（4-/-）のそれぞれの脾臓B細胞（ 1×10^5 ）を単離し、種々の濃度（0、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 又は 10^5 ng/ml）のLPS又は100 U/mlのIL-4を用いて、96ウェルプレート内で48時間培養した。培養後細胞を採取して、フィコエリトリン（phycoerythrin: PE; ファーミンジェン社製）で標識した抗B220抗体、又はビオチン化抗マウスI-A^b抗体（ファーミンジェン社製）に、フルオレセインイソシアネート（FITC; ファーミンジェン社製）で標識したストレプトアビジンを結合させたFITC標識化抗体により、それらの細胞表面におけるI-A^b分子に結合させて細胞を染色した。染色した細胞をセルクエストソフトウ

エア（ベクトンディッキンソン社製）により蛍光活性化セルソーターキャリバー（FACS Calibur）で分析した（図4B）。この結果から、Re-595のLPSは、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスの脾臓B細胞表面でのI-A^b分子の発現を増大しているのに対し、TLR4欠損マウスの脾臓B細胞では、高濃度のLPS（ 10^5 ng/ml）で刺激しても、I-A^b分子の発現は増大しなかった。以上のことから、TLR2ノックアウトマウスは、野生型マウス同様LPSに対して応答性を示すことがわかった。また、IL-4で刺激した場合は、脾臓B細胞表面でのI-A^b分子の発現はどのノックアウトマウスにおいても正常であった。

【0033】

実施例5（TLR2ノックアウトマウスのマクロファージのグラム陽性菌由来の細胞壁成分不応答性）

上記野生型マウス（wild-type）、TLR2ノックアウトマウス（TLR2-/-）、TLR4ノックアウトマウス（TLR4-/-）等のそれぞれの腹膜マクロファージのグラム陽性菌由来の細胞壁成分に対する応答性を、スタフィロコッカス・アウレウス（*S. aureus*）、コリネバクテリウム・ジフテリア（*C. diphtheriae*）及びノカルジア・コエリアカ（*N. coeliaca*）の細胞壁調製物を用いて調べた。細胞調製物は、文献（Biken J. 18, 77-92, 1975, Infect. Immun. 38, 817-824, 1982）記載の方法と同様に、適切な培養条件下で培養した細胞菌体を、ブラウン・メカニカル・セル・ホモジナイザー（MSKモデル；B. Braun Apparatebau社製）又はDyno-Mill（タイプKDL；Willy A, Biohofen Manufacturing Engineers社製）のいずれかで破壊した。破壊した細胞懸濁液の分画遠心法により得た粗細胞壁画分をプロテアーゼで処理し、細胞壁に元々存在していない成分を除去することにより精製調製した。

【0034】

それぞれのマウスの腹膜マクロファージを、種々の濃度（0、0.1、1、10又は100 μ g/ml）の上記調製物の存在下で24時間培養して刺激し、それぞれのマクロファージから放出される腫瘍壊死因子（TNF- α ）の濃度をELISAにより測定した（図5）。これらの結果から、TLR2ノックアウトマ

ウスのマクロファージは、野生型マウス及びTLR4ノックアウトマウスのものより、グラム陽性菌由来の細胞壁成分に対する応答におけるTNF α の産生が損なわれることがわかった。

【0035】

実施例6 (TLR2ノックアウトマウスのグラム陽性菌の細胞壁成分に対する応答性)

次に、グラム陽性菌のどの細胞壁成分がTLR2を介してマクロファージを活性化するのかを調べてみた。従来、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン (PGN) 及びリポタイコ酸 (LTA) が単球/マクロファージを活性化すると報告がある (Infect. Immun. 60, 3664-3672, 1992, Immunity 1, 509-516, 1994, J. Biol. Chem. 271, 23310-23316, 1996, Infect. Immun. 64, 1906-1912, 1996) ことから、10 μ g/ml のスタフィロコッカス・アウレウスのPGN (Fluka社製; 図6A) 又は10 μ g/ml のスタフィロコッカス・アウレウスのLTA (シグマ社製; 図6C) を用いて、実施例3と同様の方法により、各種マウスの腹膜マクロファージに対する応答でのIL-6及びNO $_2^-$ の産生量を測定した。また、実施例5と同様に、各種マウスの腹膜マクロファージのPGN (図6B) 又はLTA (図6D) に対する応答でのTNF α の産生を測定した。

【0036】

図6Aの結果から、野生型マウス及びTLR4ノックアウトマウスの腹膜マクロファージでは、PGNに対する応答によりIL-6を産生するのに対し、TLR2ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった。また、野生型マウス及びTLR4ノックアウトマウスの腹膜マクロファージをIFN γ の存在下でPGNといっしょに培養するとNO $_2^-$ を産生するのに対して、TLR2ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった。一方、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスの腹膜マクロファージでは、LTAに対する応答によりIL-6を産生するのに対し、TLR4ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった (図6C)。また、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスの腹膜マクロファージをIFN γ の存在下でLTAといっしょに培養する

と NO_2^- を産生するのに対して、TLR4 ノックアウトマウスのもものでは産生しないことがわかった (図 6 C)。

【0037】

図 6 B に示されているように、TLR4 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージは、野生型マウスのもと同様に、PGN の投与量に応じて $\text{TNF}\alpha$ の産生を増加させるのに対して、TLR2 ノックアウトマウスのもものでは、 $\text{TNF}\alpha$ 産生が実質的に損なわれており、PGN 不応答性であることがわかった。一方、図 6 D に示されているように、TLR2 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージは野生型マウスのもと同様に、LTA の投与量に応じて $\text{TNF}\alpha$ の産生を誘導するのに対し、TLR4 ノックアウトマウスのもものでは、 $\text{TNF}\alpha$ 産生がなく、LTA 不応答性であることがわかった。以上のことから、グラム陽性菌の細胞壁成分である PGN が TLR2 を介してマクロファージを活性することや、LTA が TLR4 を介してマクロファージを活性することがわかった。

【0038】

実施例 7 (インビトロでのキナーゼアッセイ及びウェスタンブロット)

TLR ファミリーメンバーは、アダプタータンパク質 MyD88 を介してセリン/トレオニンキナーゼである IRAK を活性化し、次いで rel 型転写因子である $\text{NF-}\kappa\text{B}$ を活性化する、細胞内シグナル伝達分子として知られている (Mol. Cell 2, 253-258, 1998, J. Exp. Med. 187, 2097-2101, 1998, Immunity 11, 115-122, 1999)。LPS 及び PGN が、かかる細胞内シグナル伝達分子を活性化するかどうかを次のようにして調べた。各種マウスの腹腔マクロファージ (1×10^6) を、 1 ng/ml のサルモネラ・ミネソタ Re-595 の LPS 又は $10 \mu\text{g/ml}$ のスタフィロコッカス・アウレウスの PGN で図 7 に示された時間刺激し、これらの細胞菌体を、溶解緩衝液 (最終濃度で 1.0% のトリトン X-100、137 mM の NaCl、20 mM のトリス-HCl、5 mM の EDTA、10% のグリセロール、1 mM の PMSF、 $20 \mu\text{g/ml}$ のアプロチニン、 $20 \mu\text{g/ml}$ のロイペプチン、1 mM の Na_3VO_4 及び 10 mM の β -グリセロリン酸を含有する緩衝液; pH 8.0) 中にて溶解し、抗 IRAK 抗体 (林原生化学研究所株式会社) で免疫沈降して、文献 (Biochem. Biophys. Res. C

ommun. 234, 183-196, 1998, Immunity 11, 115-122, 1999) 記載のように、インビトロキナーゼアッセイを行い、IRAKの自己リン酸化を測定した(図7A, BにおけるAuto)。

【0039】

また、上記溶解物を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜に移し、この膜を抗IRAK抗体(Transduction Laboratories社製)でブロットして、エンハンスド・ケミルミネッセンス装置(デュポン社製)を使用して視覚化した(図7A, BにおけるWB)。以上の結果から、LPSに対する応答でのIRAK活性化は、野生型マウス(wild-type)及びTLR2ノックアウトマウス(TLR2-/-)において観察できたが、TLR4ノックアウトマウス(TLR4-/-)では観察できなかった。一方、PGNに対する応答でのIRAK活性化は、野生型マウス及びTLR4ノックアウトマウスのみにおいて確認することができた。これらのことから、LPSはTLR4を、PGNはTLR2をそれぞれ介し認識されることがわかった。

【0040】

さらに、LPS又はPGNに対する応答によるNF- κ Bの活性化についても調べてみた。上記LPS又はPGNで刺激した各種マウスのマクロファージから核抽出物を精製し、NF- κ BのDNA結合部位に対する特異的プローブといっしょにインキュベートし、文献(Immunity 9, 143-150, 1998)記載の電気泳動移動度分析により視覚化した。その結果を図7C, Dに示す。なお、図中の矢印はNF- κ Bと特異的プローブとの複合物の位置を示し、矢頭は特異的プローブのみの位置を示している。これらの結果から、LPSに対する応答によるNF- κ BのDNA結合活性を、野生型マウス及びTLR2ノックアウトマウスのマクロファージの核抽出物において検出できたが、TLR4ノックアウトマウスのものではかかる活性を検出できなかった。一方、PGNに対する応答によるNF- κ B活性化は、野生型マウスとTLR4ノックアウトマウスのマクロファージで確認できたが、TLR2ノックアウトマウスのものでは確認できなかった。これらのことから、TLR4はLPS誘導NF- κ B活性化に、TLR2はPGN誘導NF- κ B活性化に不可欠であることがわかった。

【0041】

【発明の効果】

本発明のTLR2ノックアウトマウスは、グラム陽性菌等の細胞壁成分ペプチドグリカンに対して不応答性であり、グラム陽性菌細胞壁成分に対して低応答性であることから、本発明のTLR2ノックアウトマウスを用いることによって、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン等の選択的成分のシグナル受容体に対して有用な情報を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明のTLR2ノックアウトマウスと野生型マウスの遺伝子地図を示す図である。

【図2】

本発明のTLR2ノックアウトマウスと野生型マウスに大腸菌由来のLPSを投与した場合の生存率を示す図である。

【図3】

本発明のTLR2ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウトマウスにおけるリピドA又はLPS誘導によるIL-6、TNF α 又はNO $_2^-$ の産生量を示す図である。

【図4】

本発明のTLR2ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウトマウスの脾臓B細胞のサルモネラ・ミネソタRe-595由来LPSに対する応答性の結果を示す図である。

【図5】

本発明のTLR2ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウトマウスの腹腔マクロファージのグラム陽性菌の細胞壁成分に対する応答性の結果を示す図である。

【図6】

本発明のTLR2ノックアウトマウス、野生型マウス、TLR4ノックアウトマウスにおけるPGN又はLTA誘導によるIL-6、NO $_2^-$ 又はTNF α の産



生量を示す図である。

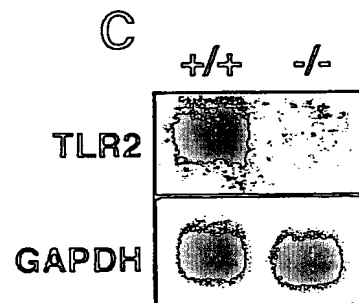
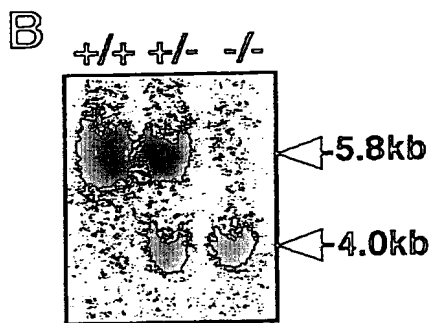
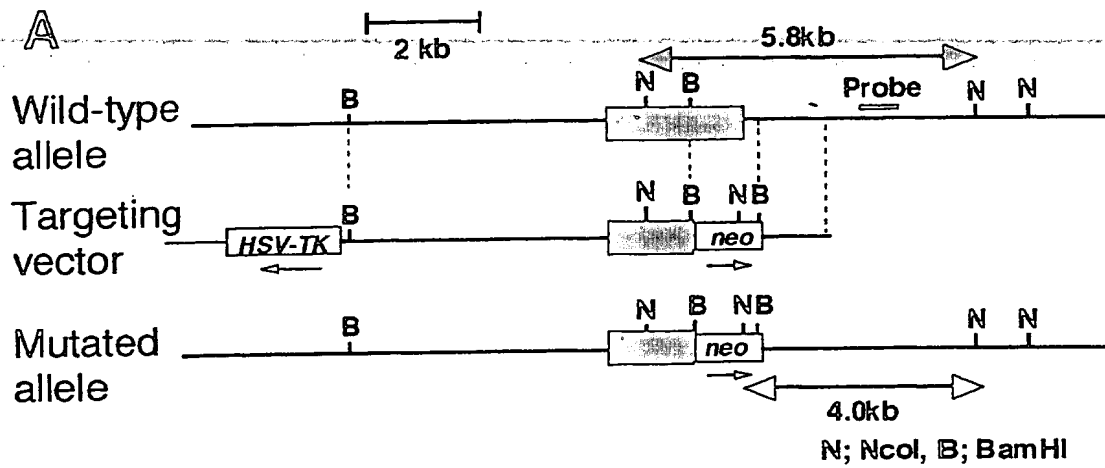
【図 7】

本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスにおけるインビトロでのキナーゼアッセイ、ウエスタンブロット分析及び電気泳動移動度分析の結果を示す図である。

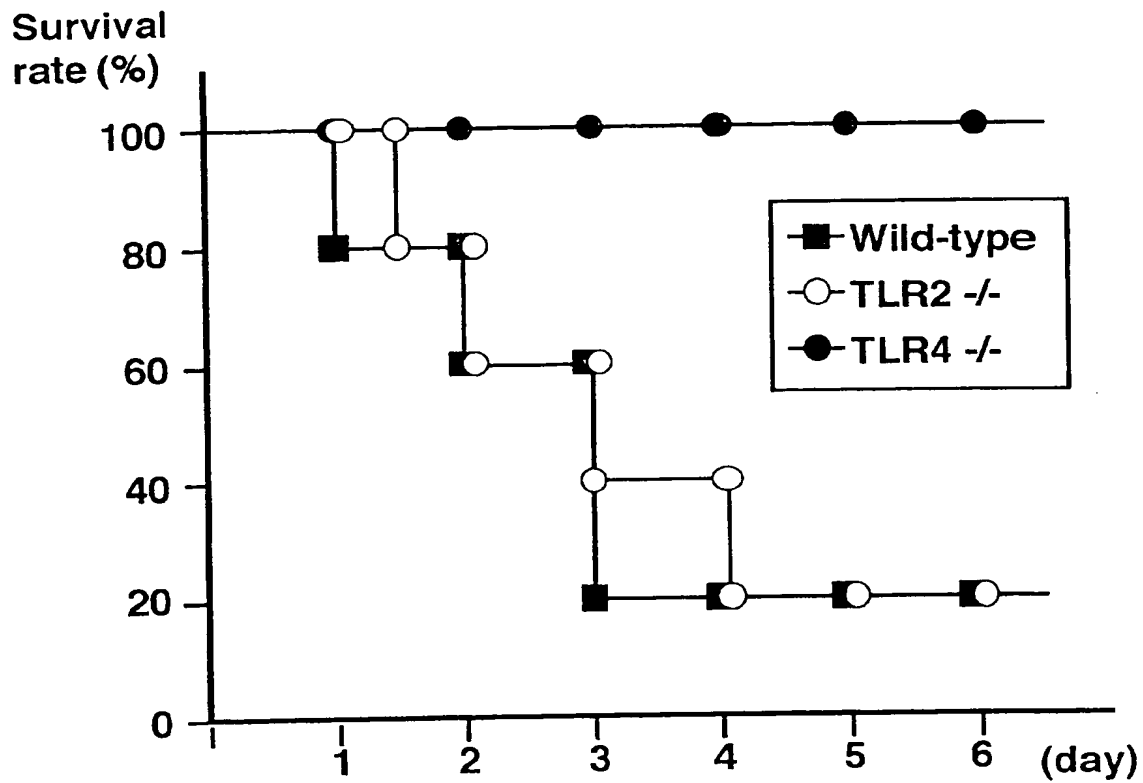
【書類名】

図面

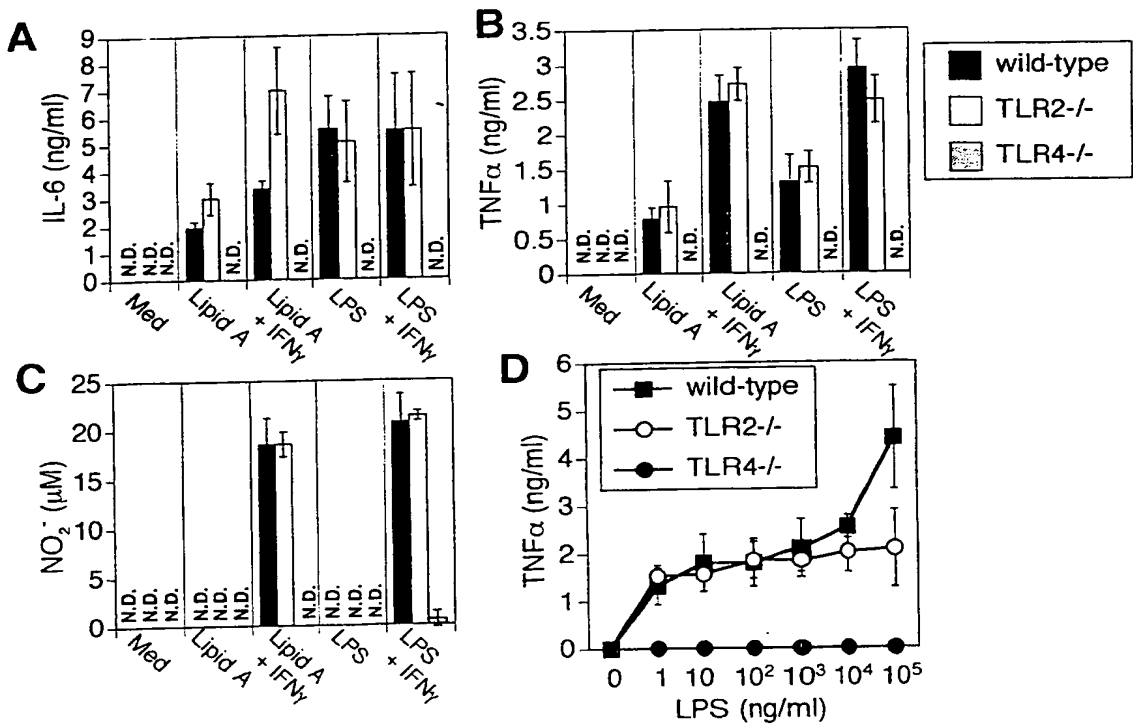
【図 1】



【図 2】

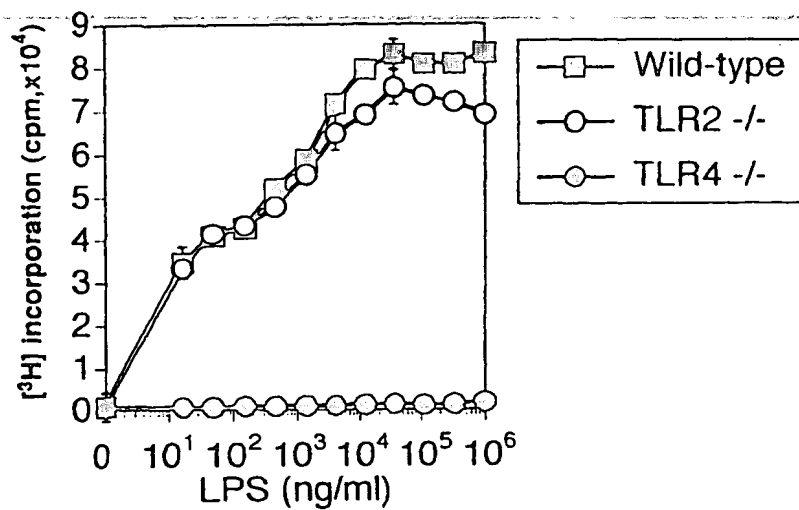


【図 3】

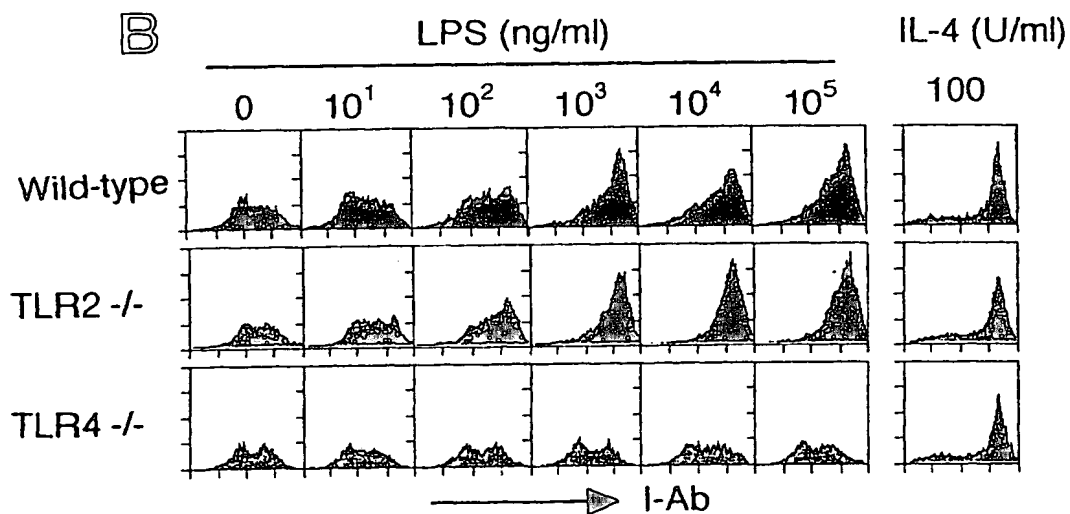


【図 4】

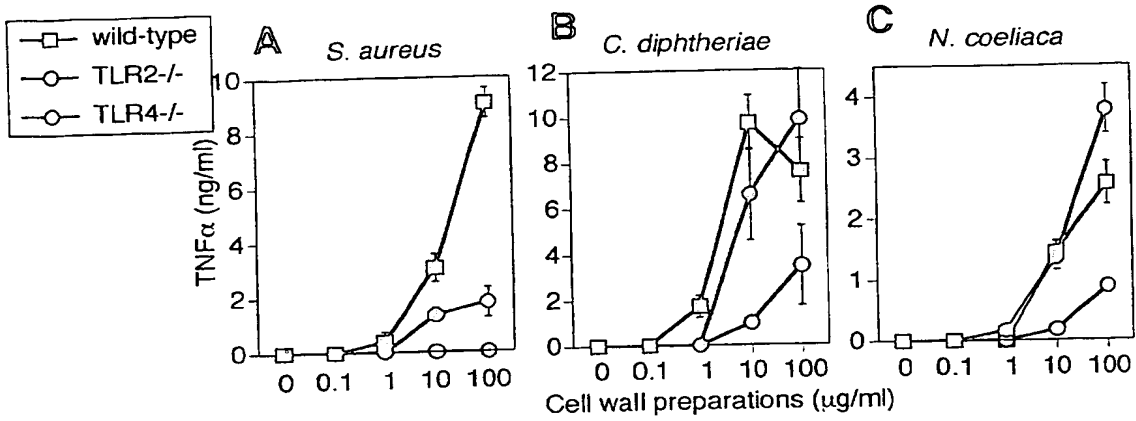
A



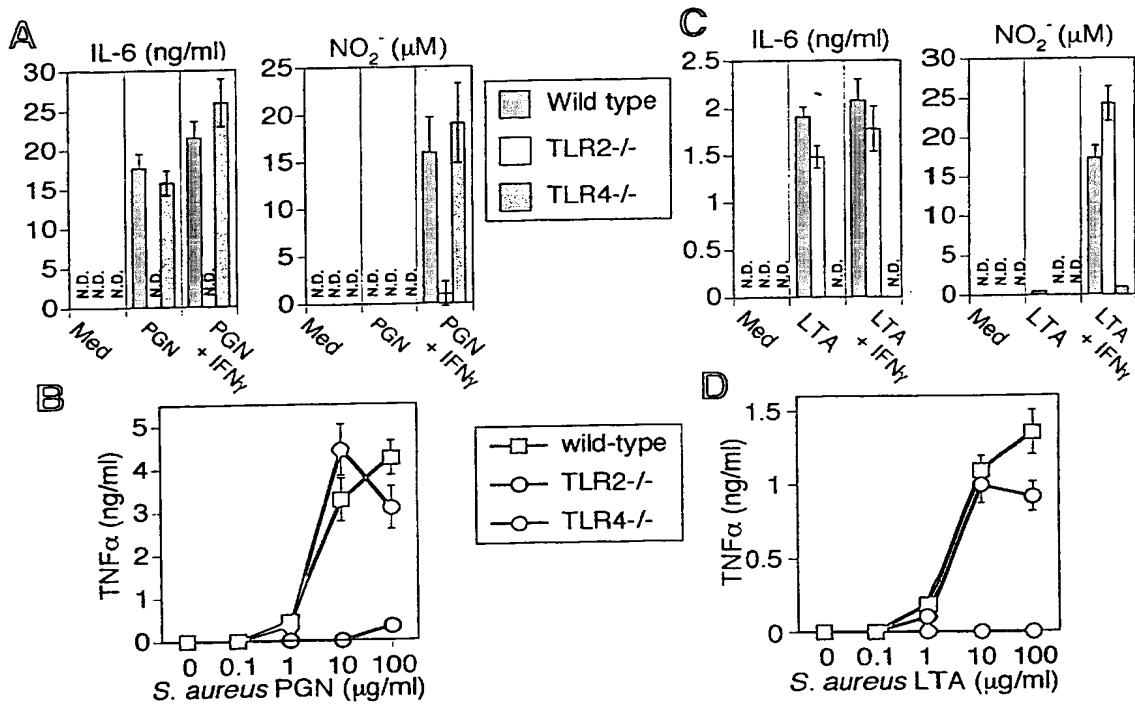
B



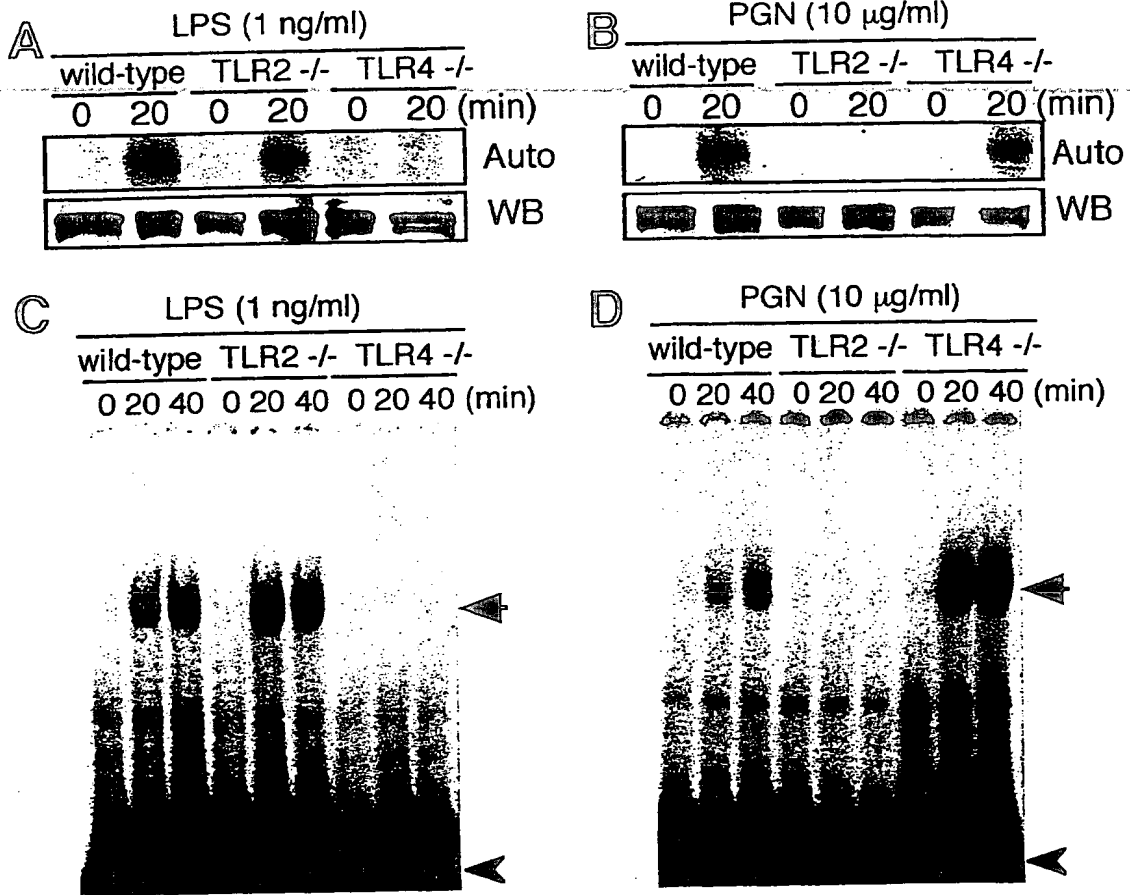
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 インビボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対する T L R ファミリー各メンバーの関わり、特に T L R 2 のインビボにおける役割を明らかにする上で有用なペプチドグリカンに対して不応答性であるノックアウトマウスを提供すること。

【解決手段】 T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換することによりターゲッティングベクターを構築し、該ターゲッティングベクターを胚幹細胞に導入し、T L R 2 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞をマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に戻すことによってペプチドグリカンに対して不応答性のノックアウトマウスを作製する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団